

EÖTVÖS LORÁND TUDOMÁNYEGYETEM
TERMÉSZETTUDOMÁNYI KAR

**GLUTAMÁTERG VEGYÜLETEK HATÁSA A
TOVATERJEDŐ DEPOLARIZÁCIÓRA, ÉS FELISMERÉSI
MEMÓRIÁBAN AZ EMLÉKNYOM KIALAKULÁSÁRA:
GYÓGYSZERFEJLESZTÉSI SZEMPONTOK**

DOKTORI ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

Kertész Szabolcs

Témavezető: Dr. habil. Lévay György
Program: Idegtudomány és humánbiológia

Budapest
2009

ELŐZMÉNYEK

Az EGIS Gyógyszergyárban neuropszichiátriai irányban folytatott gyógyszerkutatás egyik jelentős területe az ionotróp glutamáterg rendszer működését befolyásoló ligandok fejlesztése. Az AMPA receptor pozitív és negatív modulátorok preklinikai fejlesztése során felmerült az igény egy olyan *in vitro* teszt beállítására, amely elég informatív az AMPA receptor gátló, ill. potenciózó hatásra vonatkozólag, lehetővé teszi a vegyületek hatékonyságának kvantitatív összehasonlítását, és elég nagy az áteresztő-képessége a szintetizált molekulák szűrővizsgálatának kivitelezéséhez.

A vizsgálatok célja ezért egyrészt az volt, hogy az AMPA receptor negatív modulátorok gyógyszergyári tesztelésében már régóta használatos módszert, a csirke retinán kiváltott tovaterjedő depolarizációt (spreading depression: SD) a pozitív modulátorok AMPA receptor potenciózó hatásának kvantitatív vizsgálatára beállítsuk. Ezzel egyidejűleg felmerült az igény, hogy megvizsgáljuk az AMPA és kainát receptoroknak az SD kialakulásában játszott szerepét, és feltérképezzük, hogy az SD alkalmas fiziológiai modell-e a receptorszelektív ligandok vizsgálatára.

Az irodalomból ismert, hogy az SD alkalmas az NMDA receptor antagonisták hatásának tesztelésére. Érdekes volt számunkra megvizsgálni azt, hogy egyrészt az NMDA receptor működését közvetett módon serkentő, glicin transzporter-1 gátló vegyületek hatása hogyan mutatható ki a retinán kiváltott SD-ben. Másrészt, a deramciklán NMDA receptor gátló hatásának vizsgálata kapcsán kérdésként merült fel, hogy megkülönböztethető-e a különböző típusú NMDA antagonistáknak az SD-re kifejtett hatása.

A glutamáterg rendszernek, és az ionotróp glutamáterg receptorcsalád tagjaihoz kapcsolódó ligandoknak a tanulásban és a különféle memóriaformákban betöltött szerepét számos tanulási és memóriatesztben igazolták. A memórianyom kialakulásának egymást követő szakaszaira gyakorolt hatásukra vonatkozóan azonban nem egyértelműek az ismeretek. Ezért az általunk vizsgált vegyületek *in vivo* (pro)kognitív tulajdonságainak teszteléséhez végül egy olyan memóriamodellt, a tárgyfelismerés tesztet választottuk, amelyben könnyen vizsgálható volt a különféle glutamáterg ligandoknak a tanulás folyamatára és a memória kialakulásának egymást követő fázisaira gyakorolt hatása.

Munkánk célja az volt, hogy átfogóbb képet kapjunk egyrészt a tovaterjedő depolarizáció és az ionotróp glutamáterg rendszer kapcsolatáról. Másrészt célként fogalmazódott meg, hogy további részleteket ismerjünk meg a glutamáterg ligandoknak az emlékezés, ill. a tanulás szakaszaiban játszott szerepéről. Ehhez a fenti teszten hatékony, glutamáterg vegyületeknek egy kognitív modellben mért hatásait elemeztük.

BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉSEK

A pszichiátriai, neurológiai elváltozások kialakulását gyakran kíséri, illetve megelőzi a kognitív funkciók romlása. A depresszió, a szorongásos megbetegedések, a szkizofrénia, valamint a különböző neurodegeneratív kórképek gyógyítása során a gondolkodásban, tanulásban, memóriában bekövetkező romlás csökkenése, megállítása, esetleges megfordítása is terápiás cél (lehet). Mindezekből következik, hogy a kognitív folyamatok gyógyászati célzatú befolyásolásának igénye, és az ezirányú gyógyszerkutatási tevékenység jelentős mértékű.

A megfelelő kognitív működés fenntartásában számos ingerület-átvivő anyag szerepe és azok kölcsönhatása ismert (glutamát, acetilkolin, GABA, szerotonin, dopamin, stb), ezért az elváltozások gyógyszeres kezelésének számos neurotranszmitter rendszer befolyásolása lehet a terápiás célterülete. A felsoroltak közül az EGIS Gyógyszergyárban elsősorban a glutamáterg vegyületek kutatásában és fejlesztésében vettem részt.

Az EGIS Gyógyszergyárban folytatott, glutamáterg vegyületekkel kapcsolatos originális gyógyszerkutatásban a fejlesztésbe került molekuláktól alapvetően két területen vártuk a kognitív működés – kísérletes szempontból a tanulási teszteken mért teljesítmény – növekedését: a pozitív allosztérikus AMPA receptor modulátorok, valamint a glicin transzporter gátló molekulák esetében. Ezen kívül felmerült az EGIS originális vegyületének, a deramcikliánnak már korábban közölt NMDA receptor antagonistája kapcsán, hogy esetlegesen a memantinhoz hasonlóan prokognitív tulajdonsággal bír.

A gyógyszerfejlesztés során indokoltá vált egyrészt egy egyszerű, mégis elegendően informatív, nagy áteresztő-képességű *in vitro* módszer beállítása, amellyel a vizsgálandó vegyületeket első körben szűrni lehetett.

Másrészt az *in vivo* vizsgálati fázisban a vegyületek kognitív hatásának vizsgálatára egy olyan tanulási paradigmát is akartunk választani, amely pozitív és

negatív megerősítéstől mentesen, az állatok spontán, környezetet felfedező (exploratív) tevékenységét használja ki, ezáltal a humán demencia folyamatát jobban modellezi.

Ezért célul tűztük ki, hogy

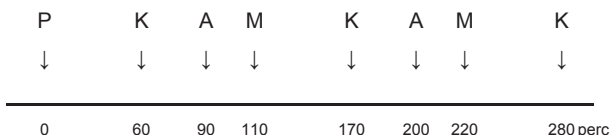
- olyan *in vitro* módszert dolgozunk ki és állítunk be, amelynek segítségével nagy számban, rövid idő alatt, és a kisebb áteresztő-képességű teszteken (patch-clamp mérés, hippocampus szelet) kapott eredményekkel összevethető módon végezhetünk hatásmechanizmus vizsgálatot gyógyszergyári fejlesztés alatt álló AMPA receptor pozitív és negatív modulátorok biológiai hatékonyságának meghatározásához. Erre a célra a csirke retinán ionotróp glutamát receptor agonistákkal kiváltott tovaterjedő depolarizáció (spreading depression – SD) megfelelő választásnak tűnt.
- megvizsgáljuk az AMPA és kainát receptor pozitív allosztérikus modulátor ligandok szerepét és kölcsönhatását AMPA-val, ill. kainsavval kiváltott SD potenciózásában csirke retinán.
- megvizsgáljuk a csirke retinán kiváltott SD teszt alkalmazhatóságát az NMDA receptor működésének fokozását előidéző (glicin transzport gátló) vegyületek hatékonyságának kvantitatív meghatározásában.
- a deramciklán NMDA receptor gátló tulajdonságára vonatkozóan kompetitív és nem kompetitív NMDA receptor antagonistá vegyülettel összehasonlító vizsgálatot végzünk csirke retinán kiváltott SD teszten
- Egy egyszerű, gyors, rágcslókon végezhető *in vivo* tanulási modellt, a tárgyfelismerés tesztet beállítva összehasonlítjuk a fejlesztés alatt álló különböző glutamaterg vegyületek tanulásra és emlékezésre kifejtett hatását.

MÓDSZEREK

Retina SD teszt

A retinák preparálását Sheardown (1993) módszere alapján végeztük. A vizsgálatokban 4-7 napos Shaver Redbrow csirkéket használtunk. Éteres altatásban végzett dekaptálás után emeltük ki a kísérleti állatok szemét, majd az egyenlítői síkban történt félbevágás utána a továbbiakban a retina hátsó részét is tartalmazó

„szemserleggel” végeztük a kísérleteket. Az SD az izolált retinában az agonista anyagra és annak koncentrációjára jellemző latencia után jelentkeznek. A kísérletek során a latenciának a kontroll értékhez viszonyított változását (az anyag jellegétől függően növekedését vagy csökkenését) mértük. A kísérlet általános menete az alábbi diagramon szemléltetett módon történt.



P: preparálás vége; K: kontroll mérés; A: anyagadás; M: anyaghatás mérése

Az időpontok a különböző serkentő és gátló vegyületek esetében a fent leírtaktól eltérőek lehettek.

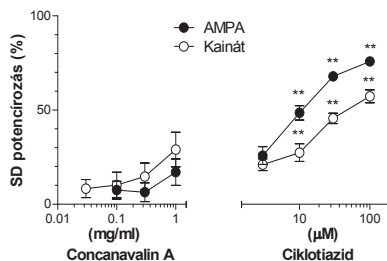
Tárgyfelismerés teszt

A vizsgálatokat Ennaceur és Delacour (1988) módszere alapján végeztük. A tesztekben hím Sprague-Dawley patkányokat használtunk. A patkányok a kísérleti terephez (dobozhoz) szoktatást követően 24 órával később, a kísérlet első napján a dobozban két egyforma tárggyal találkoztak. Ekkor stopperrel mértük, hogy az állat mennyi ideig explorálja (szaglássza) a tárgyakat. Újabb 24 óra múlva az egyik, már ismert tárgyat kicseréltük a dobozban, és mértük, hogy az állat mennyi időt tölt az ismert, illetve az új tárgy explorációjával. A kontroll állatok nem emlékeztek az ismert tárgyra, míg a prokognitív hatású anyaggal történt kezelés után a patkányok különbséget tudtak tenni az ismert és új tárgy között.

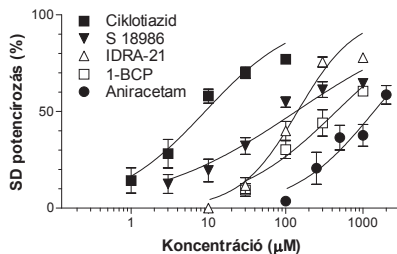
EREDMÉNYEK

Retina SD teszt

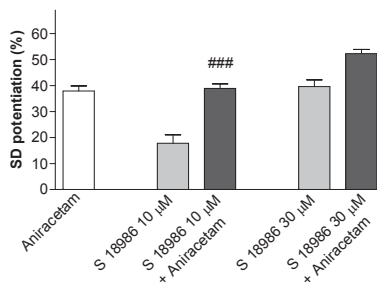
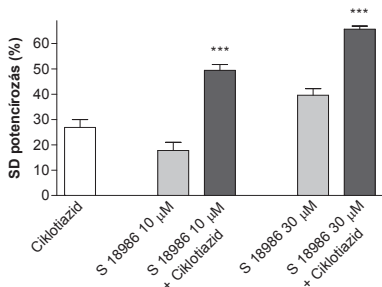
Eredményeink azt mutatják, hogy a concanavalin A az alkalmazott legnagyobb koncentrációban (1 mg/ml) sem befolyásolta szignifikánsan sem az AMPA-val, sem a kaináttal kiváltott SD-t. A ciklotiazid esetében azonban a potenciózás markánsan koncentrációfüggő volt mind az AMPA-val, mind a kaináttal kiváltott SD esetében.

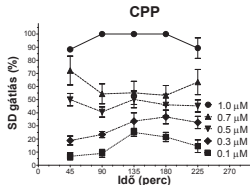
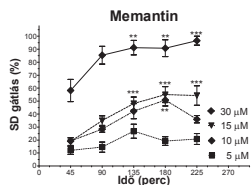
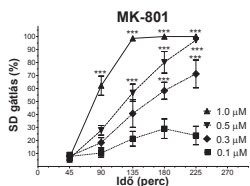
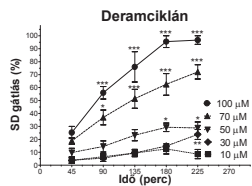


Az AMPA receptor pozitív modulátor vegyületek koncentrációfüggő módon csökkentették az SD kialakulás latenciáját

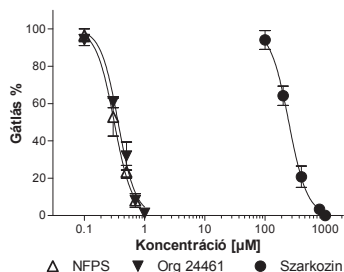


Az AMPA receptor pozitív modulátorok közötti kölcsönhatások esetében az SD potenciózó hatásnak a vegyületek szerkezeti rokonságától független addícióját figyeltük meg.





A glicin transzporter gátló vegyületek koncentráció-függő módon mérsékelték a 7-klor-kinurensav SD gátló hatását.

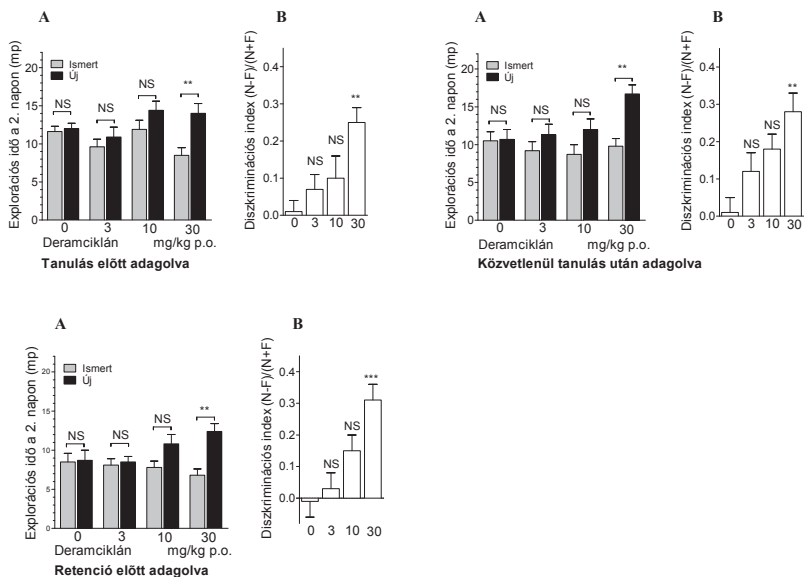


Tárgyfelismerés teszt

Az AMPA receptor működését serkentő, pozitív modulátor vegyületek memória fokozó hatásúak. Az aniracetam és az S 18986 esetében azt tapasztaltuk, hogy a memórianyom kialakulásának különböző fázisait különböző mértékben befolyásolják a vegyületek: a leghatékonyabban a bevésés szakaszát, kisebb mértékben a konszolidáció és az előhívás folyamatát potenciozzák.

Kísérleti körülményeink között az NMDA receptor működésére pozitívan ható, GlyT1 gátló vegyületek nem bizonyultak memória-serkentőnek..

A deramciklán vonatkozásában azt találtuk, hogy a deramciklán az AMPA receptor pozitív modulátor vegyületektől eltérően egyformán hatott a memórianyom bevézésére, konszolidációjára és előhívására.



EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA

- Specifikus AMPA (ciklotiazid) és kainát (concanavalin A) receptor ligandok alkalmazásával kimutattuk, hogy az AMPA-val kiváltott SD kialakulásáért elsősorban az AMPA receptor felelős, a kainát receptor csak kismértékben járul hozzá a folyamathoz.
- A pozitív modulátor vegyületeknek egymással, illetve a receptort negatívan moduláló GYKI 52466-tal való interakcióját vizsgálva az alábbi megfigyeléseket tehetjük: 1, A pozitív modulátor vegyületek azon koncentrációban, amelyben kb. 50 %-os mértékben potenciórozták az AMPA-val kiváltott SD-t, a GYKI 52466 koncentrációhatás görbéjét kompetitív jelleggel, de eltérő mértékben tolták jobbra. Ez arra utal, hogy a negatív és pozitív modulátorok kötődése részben ugyanazon a helyen

történik; 2, A pozitív modulátorok egymással való kölcsönhatásának jellegét – addíció, ill. annak hiánya – elsődlegesen nem a vegyületek szerkezeti rokonsága határozta meg. A fenti eredményekből az tételezhető fel, hogy a pozitív modulátor vegyületek receptorhoz kapcsolódásában több kötőhely vesz részt

- Igazoltuk, hogy a csirke retinán mért SD alkalmas az 1-es típusú glicin transzporter (GlyT1) gátló anyagok kvalitatív, szemikvantitatív vizsgálatára; az ilyen típusú anyagok gyógyszerfejlesztési célzatú szűrővizsgálatára.
- Csirke retina preparátumon összevetettük a deramciklán (EGIS-3886) NMDA receptor gátló hatását az ioncsatorna gátló MK-801 és memantin, valamint a kompetitív antagonistá CPP hatásával. Kimutattuk, hogy a deramciklán, a csatornagátló vegyületekhez hasonlóan, aktivitásfüggő módon gátolja az NMDA receptor működését.
- Patkány tárgyfelismerés teszten *in vivo* végzett vizsgálatokban a szakirodalomban leírtakkal megegyezően azt találtuk, hogy az AMPA receptor működését serkentő, pozitív modulátor vegyületek memória fokozó hatásúak. Az aniracetam és az S18986 esetében kimutattuk, hogy a memórianyom kialakulásának különböző fázisait különböző mértékben befolyásolják a vegyületek: a leghatékonyabban a bevézés szakaszát, kisebb mértékben a konszolidáció és az előhívás folyamatát potenciózzák. Feltevésünk szerint ez arra utal, hogy amíg az AMPA receptor gátlása az irodalmi adatok többsége alapján gátolja a memórianyom kialakulásának összes szakaszát, addig az AMPA receptor serkentése a felidézés során kevésbé segíti az előzőleg kellő mértékben be nem vésődött emlényom előhívását.
- Kísérleti körülményeink között az NMDA receptor működésére pozitívan ható, GlyT1 gátló vegyületek nem bizonyultak memória-serkentőnek.
- Elsőként írtuk le, hogy a deramciklán javítja a patkányok memóriáját tárgyfelismerés teszten. Azt találtuk, hogy a deramciklán az AMPA receptor pozitív modulátor vegyületektől eltérően egyformán hatott a memórianyom bevézésére, konszolidációjára és előhívására. A tárgyfelismerés teszten nyert adataink alapján azt a feltételezést tettük, hogy a deramciklán prokognitív hatásában – a memantinhoz hasonlóan – feltehetően szerepet játszanak a vegyület NMDA receptor gátló tulajdonságának jellegzetességei.

A TÉZISEKBEN IDÉZETT IRODALOM

Sheardown, M.J. (1993) The triggering of spreading depression in the chicken retina: A pharmacological study. *Brain Research* **607**:189-194.

Ennaceur, A.; Delacour, J. (1988) A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. I.: Behavioral data. *Behavioural Brain Research* **31**:47-59.

CIKKEK A DOLGOZAT TÉMAKÖRÉBŐL:

Kertész, S.; Kapus, G.; Gacsályi, I.; Lévy, G. Deramciclane improves object recognition in rats: potential role of NMDA receptors. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*; Közlésre benyújtva

Kertész, S.; Kapus, G.; Lévy, G. (2004) Interactions of allosteric modulators of AMPA/kainate receptors on spreading depression in the chicken retina. *Brain Research* **1025**:123-129.

EGYÉB KÖZLEMÉNYEK

Szénási, G.; Végh, M.; Szabó, G.; Kertész, S.; Kapus, G.; Albert, M.; Greff, Z.; Ling, I.; Barkóczy, J.; Simig, G.; Spedding, M.; Hársing, L.G. Jr. (2008) 2,3-benzodiazepine-type AMPA receptor antagonists and their neuroprotective effects. *Neurochemistry International* **52**:166-183.

Gigler, G.; Móricz, K.; Ágoston, M.; Simó, A.; Albert, M.; Benedek, A.; Kapus, G.; Kertész, S.; Végh, M.; Barkóczy, J.; Markó, B.; Szabó, G.; Matucz, E.; Gacsályi, I.; Lévy, G.; Hársing, L.G. Jr.; Szénási, G. (2007) Neuroprotective and anticonvulsant effects of EGIS-8332, a non-competitive AMPA receptor antagonist, in a range of animal models. *British Journal of Pharmacology* **152**:151-160.

Kertész, S.; Vegh, M.; Kapus, G.; Gigler, G.; Wellmann, J.; Szénási, G.; Barkóczy, J.; Hársing, L.G. Jr.; Simig, G.; Lévy, G. (2007) Improvement of AMPA antagonist activity by methyl substitution on the aniline ring of 2,3-benzo diazepine derivatives. *European Neuropsychopharmacology* **17**:S267 (poszter)

Gressens, P.; Spedding, M.; Gigler, G.; Kertész, S.; Villa, P.; Medja, F.; Williamson, T.; Kapus, G.; Lévy, G.; Szénási, G.; Barkóczy, J.; Hársing, L.G. Jr. (2005) The effects of AMPA receptor antagonists in models of stroke and neurodegeneration. *European Journal of Pharmacology* **519**:58-67.

Kapus, G.; Kertész, S.; Gigler, G.; Simó, A.; Végh, M.; Barkóczy, J.; Hársing Jr, L.G.; Szabó, G.; Lévy, G. (2004) Comparison of the AMPA antagonist action of new 2,3 benzodiazepines *in vitro* and their neuroprotective effects *in vivo*. *Pharmaceutical Research* **21**:317-323.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönetemet szeretném kifejezni mindazon munkatársaimnak, akik az EGIS Gyógyszergyárban munkájukkal, javaslataikkal és biztatásukkal elősegítették, hogy ez a dolgozat elkészülhessen.

Külön köszönöm témavezetőmnek, dr. Lévy Györgynek mindazt a szakmai iránymutatást, segítséget és buzdítást, amelynek eredményeképpen ez az értekezés megszülethetett.

Köszönettel tartozom továbbá dr. Kapus Gábor kollégámnak, akinek ötletei, tanácsai és kritikai megjegyzései jelentősen hozzájárultak dolgozatom elkészültéhez.

Köszönöm feleségemnek és gyermekeimnek a türelmet, kitartást és szeretetet, amellyel az elmúlt időszakban is körülvettek és támogattak.

ÖSSZEFOGLALÁS

A doktori értekezés glutamát receptorra ható vegyületeknek a tovaterjedő depolarizációra *in vitro*, valamint felismerési memória teszten az emlényom kialakulására *in vivo* gyakorolt hatását tárgyalja gyógyszerfejlesztési szempontok figyelembevételével.

- Az EGIS Gyógyszergyárban a glutamáterg vegyületek vizsgálatára beállítottuk a tovaterjedő depolarizáció (spreading depression, SD) *in vitro* modelljét csirke retinában. AMPA és kainát receptorra ható specifikus ligandok alkalmazásával kimutattuk, hogy a kainát receptorral szemben az AMPA receptor felel döntően az SD kialakulásáért. Az irodalomban elsőként írtuk le az AMPA receptor pozitív modulátor vegyületeknek az SD-re gyakorolt hatását. Vizsgáltuk pozitív modulátor vegyületeknek egymással, illetve a receptort negatívan moduláló GYKI 52466-tal való interakcióját. A pozitív modulátorok azonos hatékonyságú, SD potenciórozó koncentrációban kompetitív módon, de eltérő mértékben befolyásolták a GYKI 52466 gátló hatását. A pozitív modulátorok egymással való kölcsönhatásának jellegét – addíció, ill. annak hiánya – elsődlegesen nem a vegyületek szerkezeti rokonsága határozta meg. Eredményeink összhangban vannak a szakirodalomban közölt adatokkal, amennyiben közvetve arra utalnak, hogy 1) a pozitív és negatív modulátor vegyületek AMPA receptorhoz kötődése részben azonos helyen történik; 2) a pozitív modulátorok kötődésében pedig önmagában a szoros szerkezeti rokonság nem jelent azonos kötőhelyet, esetükben több allosztérikus helyet feltételezhetünk.
- Az EGIS Gyógyszergyárban új szerkezetű AMPA receptor pozitív és negative modulátor vegyületek kifejlesztésében vettem részt.
- Igazoltuk, hogy a csirke retinán mért SD alkalmas az 1-es típusú glicin transzporter (GlyT1) gátló anyagok kvalitatív, szemikvantitatív vizsgálatára; az ilyen típusú anyagok gyógyszerfejlesztési célzatú szűrővizsgálatára.
- Csirke retina preparátumon összevetettük a deramciklán (EGIS-3886) NMDA receptor gátló hatását az ioncsatorna gátló MK-801 és memantin, valamint a kompetitív antagonistá CPP hatásával. Kimutattuk, hogy a deramciklán, a csatornagátló vegyületekhez hasonlóan, aktivitásfüggő módon gátolja az NMDA receptor működését.
- Patkány tárgyfelismerés teszten *in vivo* végzett vizsgálatokban kimutattuk, hogy az AMPA receptor működését serkentő, pozitív modulátor vegyületek a szakirodalomban leírtakkal megegyezően memóriafokozó hatásúak. Kísérleti körülményeink között az NMDA receptor működésére pozitívan ható, GlyT1 gátló vegyületek nem bizonyultak memória-serkentőnek. A szakirodalomban elsőként közöltünk adatot arról, hogy a deramciklán javítja a patkányok memóriáját tárgyfelismerés teszten. A deramciklán prokognitív hatásában – a memantinhoz hasonlóan – feltehetően szerepet játszanak a vegyület NMDA receptor gátló tulajdonságának jellegzetességei.

SUMMARY

This thesis discusses the effect of glutamatergic ligands on the retinal spreading depression (SD) *in vitro*, and on recognition memory *in vivo*.

- The chicken retinal SD model was set up at the EGIS Pharmaceuticals Plc to investigate the effect of glutamatergic ligands on SD. Using specific AMPA and kainate receptor ligands, we demonstrated that mainly AMPA receptors mediate, and kainate receptors may scarcely participate in initiating SD in the retina. We were the first to publish the effect of AMPA receptor positive modulators on SD. Also the interaction of positive modulators with each other or with the negative modulator, GYKI 52466 was tested. Equiactive SD potentiating concentrations of positive modulators shifted the AMPA antagonist effect of GYKI 52466 to the right in a competitive manner but to various degrees. Regarding positive modulators, the measured addition or the lack of addition of SD potentiating effect of the compounds was not determined by the structural homology of positive modulators. Our results are in accordance with the literature, as they indicate that 1) positive and negative modulators bind to the AMPA receptors at least partly at the same binding site; 2) the close structural similarity of the positive modulators does not refer to the same binding site at the AMPA receptor, rather to the existence of separated allosteric sites or subsites.
- We contributed to the development of new AMPA receptor positive and negative modulator compounds at EGIS Pharmaceuticals Plc.
- We demonstrated that SD in the chicken retina is suitable for qualitative, semiquantitative pharmacological screening of the glycine transporter 1 (GlyT1) inhibitory potency of different compounds.
- The NMDA antagonist effect of deramciclane (EGIS-3886) in the chicken retinal SD was determined and compared to that of the uncompetitive antagonists, MK-801 and memantine, and of the competitive antagonist, CPP. We described that deramciclane inhibited SD in an uncompetitive, activity-dependent manner, similarly to memantine and MK-801.
- Object recognition test (OR) in the rat was performed to evaluate procognitive efficacy of different glutamatergic ligands. AMPA receptor positive modulators were found to improve memory retrieval in OR. Our results are in accordance with data in the literature. The GlyT1 inhibitors that indirectly facilitate NMDA receptor mediated neurotransmission, however, showed no procognitive activity on our experimental conditions. We were the first to demonstrate that deramciclane improved memory retrieval in OR in the rat, and proposed that the NMDA antagonist potency and characteristics – similarly to memantine – may play a pivotal role in the procognitive effect of deramciclane.